

Instruções de utilização

InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit

INVITEK
diagnostics



Língua: PT



REF 1060100200
1060100300



50 preparações
250 preparações



ALS Life Sciences Portugal, S.A.
Zona Industrial de Tondela, ZIM II,
Lote 6, 3460-070 Tondela
Portugal

Notas importantes

Obrigado por ter adquirido o **InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit** da Invitek Diagnostics.

O produto destina-se ao isolamento manual de ARN total de uma variedade de amostras humanas, como, por exemplo, cultura de células, tecidos e sangue venoso, utilizando a tecnologia de coluna de purificação.

ATENÇÃO! O manuseamento inadequado e o uso para fins diferentes da utilização pretendida podem causar perigo e danos. Por isso, solicitamos que leia estas instruções de utilização com atenção e as siga cuidadosamente. Mantenha-as sempre ao seu alcance. Para evitar ferimentos pessoais, observe também as instruções de segurança.

Todas as versões das instruções de utilização podem ser encontradas no nosso website para download ou podem ser solicitadas através do endereço: www.invitek.com

Contacto:

Apoio técnico:

techsupport@invitek.com

ALEMANHA

Haynauer Str. 60, 12249 Berlim, Alemanha

PORTUGAL

Zona Industrial de Tondela, ZIM II, Lote 6, 3460-070 Tondela, Portugal

+351 232 817 817

© 2025 Invitek Diagnostics, todos os direitos reservados.

O kit está em conformidade com o REGULAMENTO (UE) 2017/746 relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*. No entanto, não se destina ao uso para diagnóstico *in vitro* em países onde o REGULAMENTO (UE) 2017/746 não é reconhecido.

Marcas comerciais: InviSorb®, PSP®, InviMag®, Eppendorf®. As marcas registadas, marcas comerciais, etc. mencionadas neste documento, mesmo que não sejam especificamente identificadas como tal, não devem ser consideradas desprotegidas por lei.

InviGenius®, InviMag®, InviSorb®, Invitek®, InviTrap®, MSB®, PSP®, RTP® são marcas registadas da Invitek Molecular GmbH.

Índice

1.	Instruções de segurança.....	3
2.	Informações sobre o produto	5
2.1	Conteúdo do kit	5
2.2	Reagentes e equipamento a fornecer pelo utilizador	6
2.3	Armazenamento, aspeto e prazo de validade	6
2.4	Utilização prevista	7
2.5	Informações e especificações do produto	7
2.6	Princípio e procedimento.....	8
3.	Extração de ácido nucleico com o InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit	9
3.1	Antes de iniciar um protocolo	9
3.2	Amostragem e armazenamento do material inicial	10
3.3	Preparação dos materiais iniciais	11
3.3.1	Cultura celular	11
3.3.2	Amostras de tecido	11
3.3.3	Tecidos incluídos em parafina tratados com formalina (cortes de parafina)	12
3.3.4	Sangue	13
3.4	Protocolo curto InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit	14
3.5	Protocolo 1: Extração de ARN total de culturas celulares.....	16
3.6	Protocolo 2: Extração do ARN total do tecido.....	18
3.7	Protocolo 3: Extração de ARN total do sangue total	19
3.8	Protocolo suplementar (RUO): Isolamento simultâneo de ADN e ARN	21
3.9	Protocolo suplementar (RUO): Digestão do ADN no RNA-RTA Spin Filter.....	24
3.10	Protocolo suplementar (RUO): Extração de ARN da fase aquosa de Trizol	25
3.11	Protocolo suplementar (RUO): Extração de ARN de amostras líquidas, como misturas de reação ou fluidos corporais	26
4.	Apêndice.....	28
4.1	Resolução de problemas.....	28
4.2	Garantia	29
4.3	Símbolos utilizados no produto e na rotulagem	29
4.4	Outros documentos e informações complementares.....	30
4.5	Informações para encomenda.....	30

1. Instruções de segurança

Certifique-se de que qualquer pessoa que utilize este produto recebeu instruções sobre as práticas gerais de segurança para laboratórios, bem como as informações de segurança fornecidas neste documento.

- Quando e enquanto trabalhar com produtos químicos, use sempre vestuário de proteção, luvas descartáveis e óculos de segurança.
- Substituir sempre as pontas de pipeta entre transferências de líquidos. Para evitar a contaminação cruzada, recomendamos a utilização de pontas de pipeta com barreira de aerossóis.
- Não reutilizar os consumíveis.
- Descartar as luvas se ficarem contaminadas.
- Não combinar componentes de kits diferentes.
- Evitar a contaminação microbiana dos reagentes do kit.
- Para minimizar o risco de infecções causadas por material potencialmente infeccioso, recomendamos que se trabalhe em câmara de fluxo laminar até as amostras serem lisadas.

Antes de manusear produtos químicos, leia e compreenda todas as fichas de dados de segurança (FDS) aplicáveis. Estas estão disponíveis em www.invitek.com.

Elimine os resíduos do kit e os fluidos residuais em conformidade com os regulamentos do seu país e consulte novamente a FDS. A Invitek Diagnostics não realizou testes nos resíduos líquidos gerados pelo kit para detetar materiais infecciosos residuais. Embora a contaminação dos resíduos líquidos com materiais infecciosos residuais seja altamente improvável, esta não pode ser completamente excluída. Por conseguinte, os resíduos líquidos devem ser considerados infecciosos e devem ser manuseados e eliminados de acordo com os regulamentos de segurança locais.

As frases de risco e de segurança da Comunidade Europeia aplicadas aos componentes do **InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit** estão enumeradas a seguir:

Lysis Solution TR



Perigo

Contém: tiocianato de guanidínio; N-lauroilsarcosinato de sódio

Advertências de perigo

H302+H332 - Nocivo por ingestão ou inalação.

H314 - Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.

H412 - Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros

Recomendações de prudência

P260 - Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.

P264 - Lavar as mãos, os antebraços e o rosto cuidadosamente após manuseamento.

P270 - Não comer, beber ou fumar durante a utilização deste produto.

P271 - Utilizar apenas ao ar livre ou em locais bem ventilados.

P273 - Evitar a libertação para o ambiente.

P280 - Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial/protecção auditiva.

P301+P312 - EM CASO DE INGESTÃO: caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

P301+P330+P331 - EM CASO DE INGESTÃO: Enxaguar a boca. NÃO provocar o vômito.

P303+P361+P353 - SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água.

P501 - Eliminar o conteúdo/recipiente num ponto de recolha de resíduos perigosos ou especiais, de acordo com a regulamentação local, regional, nacional e/ou internacional.

Wash Buffer R1



Perigo

Contém: tiocianato de guanidínio

Advertências de perigo

H302 - Nocivo por ingestão.

H314 - Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.

H412 - Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

Recomendações de prudência

P260 - Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.

P264 - Lavar as mãos, os antebraços e o rosto cuidadosamente após manuseamento.

P270 - Não comer, beber ou fumar durante a utilização deste produto.

P273 - Evitar a libertação para o ambiente.

P280 - Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial/protecção auditiva.

P301+P312 - EM CASO DE INGESTÃO: caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

P301+P330+P331 - EM CASO DE INGESTÃO: Enxaguar a boca. NÃO provocar o vômito.

P303+P361+P353 - SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água.

P304+P340 - EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração.

P501 - Eliminar o conteúdo/recipiente num ponto de recolha de resíduos perigosos ou especiais, de acordo com a regulamentação local, regional, nacional e/ou internacional.

Buffer EL concentrate



Atenção

Contém: cloreto de amónio

Advertências de perigo

H302 - Nocivo por ingestão.

H319 - Provoca irritação ocular grave.

Recomendações de prudência

P264 - Lavar as mãos, os antebraços e o rosto cuidadosamente após manuseamento.

P270 - Não comer, beber ou fumar durante a utilização deste produto.

P280 - Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial/protecção auditiva.

P301+P312 - EM CASO DE INGESTÃO: caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

P305+P351+P338 - SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar.

P330 - Enxaguar a boca.

P337+P313 - Caso a irritação ocular persista: consulte um médico.

P501 - Eliminar o conteúdo/recipiente num ponto de recolha de resíduos perigosos ou especiais, de acordo com a regulamentação local, regional, nacional e/ou internacional.

Informações médicas de emergência podem ser obtidas 24 horas por dia em infotrac, www.infotrac.net:

fora dos EUA: 1 - 352 - 323 - 3500
nos EUA: 1 - 800 - 535 - 5053

2. Informações sobre o produto

2.1 Conteúdo do kit

	50 preparações	250 preparações
N.º de catálogo	1060100200	1060100300
Buffer EL concentrate	30 ml/garrafa	4 x 30 ml/garrafa
Lysis Solution TR	50 ml/garrafa	250 ml/garrafa
Zirconia Beads I	1 frasco	5 frascos
Zirconia Beads II	1 frasco	5 frascos
Wash Buffer R1	20 ml/garrafa (volume final 40 ml)	80 ml/garrafa (volume final 160 ml)
Wash Buffer R2	2 x 12 ml/garrafa (volume final 2 x 60 ml)	2 x 40 ml/garrafa (volume final 2 x 200 ml)
Elution Buffer R	15 ml/garrafa	30 ml/garrafa
DNA-Binding Spin Filter	50 unidades	250 unidades
RNA-RTA Spin Filter Set	50 unidades	250 unidades
2.0 ml Receiver Tubes	100 unidades	500 unidades
RTA Receiver Tubes	50 unidades	250 unidades
1.5 ml Receiver Tubes	50 unidades	250 unidades
Protocolo curto	1 folheto	1 folheto

2.2 Reagentes e equipamento a fornecer pelo utilizador

Equipamento de laboratório:

- Microcentrífuga (*todos os protocolos foram validados com uma Centrífuga 5415 D Eppendorf*)
- Opcional: centrífuga para tubos de 15 ou 50 ml
- Agitador térmico (37°C - 95°C)
- Proveta graduada (250 ml)
- 1 frasco vazio (1L) para diluir o EL Buffer (necessário para as amostras de sangue)
- Luvas descartáveis
- Pipeta e pontas de pipeta, sem RNase
- Agitador vortex
- Tubos de reação (1,5 ml, 2,0 ml, 15 ml)

Líquidos e solventes:

- Água livre de DNase/RNase
- Etanol a 96-100% (não desnaturado)
- Etanol a 70% (não desnaturado)
- Ditioneitol (DTT)
- Facultativo: β -Mercaptoetanol
- Facultativo (para cortes em parafina): octano ou xileno, proteinase K, RNase free TE buffer (50 mM TrisCl pH 8 com 10 mM EDTA)

2.3 Armazenamento, aspeto e prazo de validade

Prazo de validade: Todos os tampões e componentes do kit devem ser armazenados à temperatura ambiente, exceto quando indicado em contrário, e têm um prazo de validade conforme indicado no rótulo exterior da embalagem do kit.

Após a abertura, os componentes individuais do kit, bem como os componentes preparados em conformidade antes da primeira utilização, têm um prazo de validade de 3 meses.

Antes de cada utilização, certifique-se de que todos os componentes estão à temperatura ambiente. Se houver precipitados relacionados com a temperatura nas soluções, dissolva-os por aquecimento cuidadoso (até 30°C).

A temperatura ambiente (TA) é definida como um intervalo de 15-30°C.

Wash Buffer R1, Wash Buffer R2: após adicionar etanol aos frascos, estes devem ser firmemente fechados e armazenados à temperatura ambiente.

Buffer EL: uma vez diluído com água livre de DNase/RNase, o Buffer EL deve ser armazenado a 2-8°C.

1 M DTT Solution (não fornecida): conservar a -20°C para evitar danos oxidativos. Nestas condições, a 1 M DTT solution é estável durante 12 meses. Recomenda-se a aliquotagem da 1 M DTT solution para minimizar o número de ciclos de congelação-descongelação.

2.4 Utilização prevista

O InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit é um kit de extração de ácidos nucleicos baseado na tecnologia de coluna de purificação, destinado ao isolamento e purificação de ARN total.

O kit pode ser utilizado para uma variedade de tipos de amostras humanas, tais como cultura de células frescas ou congeladas, material/tecido de biópsia fresco ou congelado, tecido incluído em parafina tratado com formalina, sangue venoso total fresco anticoagulado com EDTA ou citrato, camada leucoplaquetária e leucócitos.

O produto não se destina a ser utilizado com amostras de sangue heparinizado, nem com amostras de sangue congelado. O produto destina-se exclusivamente à utilização por profissionais, tais como técnicos de laboratório, médicos e biólogos com formação em técnicas de biologia molecular e procedimentos de diagnóstico *in vitro*.

2.5 Informações e especificações do produto

Material inicial	Rendimento	Qualidade	Tempo
Cultura de células, até 1×10^7 células/ml	Até 80 µg de ARN total Por exemplo, 10 - 15 µg de ARN total de 5×10^5 fibroblastos NIH 3T3	$A_{260}:A_{280}$ 1.8 - 2.3	aprox. 20 - 25 min (incl. lise)
Até 1,5 ml de sangue total fresco (estabilizado com EDTA/citrato, mas <u>não com</u> heparina)	até 1 - 5 µg de ARN total / ml de sangue total (dependendo da contagem de leucócitos)	$A_{260}:A_{280}$ 1.8 - 2.3	aprox. 45 min (incluindo tratamento com Buffer EL)
Até 20 mg de tecido fresco ou congelado	até 80 µg de ARN total (dependendo do tipo e quantidade de material de partida)	$A_{260}:A_{280}$ 1.8 - 2.3	aprox. 15 - 20 min (excl. homogeneização da amostra)

O rendimento e a qualidade dos ácidos nucleicos purificados dependem do tipo de amostra, da origem da amostra, do transporte, do armazenamento, da idade e, no caso das amostras de sangue, também da contagem de leucócitos.

Para a purificação de ARN a partir de amostras de células, a contagem de células não deve exceder 1×10^7 células/ml. Uma contagem de células superior pode resultar em contaminação do ADN, menor pureza do ARN e obstrução do RTA Spin Filter.

Para a purificação de ARN de sangue venoso total, o kit está validado para contagens de leucócitos de 3×10^6 a 1×10^7 células/ml. O sangue total de um adulto saudável contém aproximadamente 4×10^6 - 1×10^7 leucócitos/ml de volume de amostra. Uma contagem excessivamente elevada de células pode levar à obstrução do RTA Spin Filter e, conseqüentemente, a efeitos indesejáveis no processo de purificação. Recomenda-se, por isso, que se considere o volume de entrada da amostra como um parâmetro durante a implementação do seu protocolo de diagnóstico *in vitro*. Como a extração de amostras se baseia em leucócitos intactos, não pode ser utilizado sangue congelado, uma vez que o congelamento provoca danos nos leucócitos.

Para a purificação do ARN de tecidos incluídos em parafina tratados com formalina, o rendimento e a qualidade dependem de vários fatores, como o tipo de amostra, a sua idade,

a preparação da amostra e as secções utilizadas para a extração. Para mais informações sobre a preparação e o pré-tratamento das amostras, consultar os capítulos 3.2 e 3.3.

O kit contém vários protocolos suplementares (RUO) para o isolamento simultâneo de ADN e ARN, digestão de DNase no RNA-RTA Spin Filter, limpeza de amostras de Trizol e extração de ARN de amostras líquidas como misturas de reação, saliva ou outros fluidos corporais. Todos os protocolos suplementares destinam-se apenas a utilização em investigação e não estão abrangidos pela certificação CE-IVD.

Aplicações posteriores:

O rendimento e a qualidade do ADN genómico isolado são geralmente adequados para diversas aplicações de diagnóstico molecular, tais como técnicas de PCR, NGS, métodos de hibridação e tipagem HLA. As aplicações subsequentes devem ser efetuadas de acordo com as especificações dos respetivos fabricantes.

2.6 Princípio e procedimento

1. Pré-tratamento das amostras

Na preparação para a lise, deve ser efetuado um pré-tratamento específico da amostra. No caso das células, por exemplo, o meio de cultura deve ser removido, as células dos tecidos devem ser completamente rompidas e homogeneizadas. No caso de tecidos incluídos em parafina tratados com formalina, é necessário um pré-tratamento com octano ou xileno.

Para amostras de sangue, é necessário um tratamento com Buffer EL. O sangue humano de pessoas saudáveis contém cerca de 1000 vezes mais eritrócitos do que leucócitos, sendo que apenas estes últimos contêm ARN. O EL Buffer tem um efeito hipotónico e provoca a lise osmótica dos eritrócitos. Ao adicionar o tampão à amostra de sangue, os eritrócitos são lisados seletivamente enquanto os leucócitos permanecem intactos.

2. Lise das amostras

Para a lise das amostras, estas são misturadas com a Lysis Solution TR contendo DTT. De notar que a Lysis Solution TR deve ser misturada com DTT, que não está incluído no kit, antes de cada utilização. A Lysis Solution TR contém uma suspensão com partículas transportadoras minerais que ligam eficazmente o ADN durante a lise celular. O DTT é adicionado para inativar as RNases através da clivagem de pontes dissulfureto intramoleculares. Devido às condições de lise fortemente desnaturantes, as células são rapidamente quebradas e as RNases são inativadas simultaneamente.

3. Ligação e remoção de ADN

As partículas de suporte mineral carregadas de ADN da Lysis Solution TR contendo DTT são removidas por granulação ou por centrifugação com o DNA-Binding Spin Filter, dependendo do material de partida e do protocolo de extração de ácido nucleico correspondente.

Em geral, a digestão com DNase não é necessária para a remoção do ADN genómico. No entanto, para aplicações de ARN que tenham uma maior sensibilidade à contaminação por ADN, pode ser efetuada a digestão com DNase. Para a digestão com DNase durante o protocolo de purificação do ARN, consultar o Protocolo Suplementar 3.9. Em alternativa, é possível efetuar uma digestão após a purificação no eluato.

4. Ligação de ARN total

Após a remoção do ADN genómico, o ARN total encontra-se no sobrenadante. Para ajustar as condições de ligação do ARN, é adicionado etanol a 96 - 100% e a mistura é transferida para o RNA-RTA Spin Filter Set. O ARN liga-se à membrana do Spin Filter.

5. Lavagem para remoção de contaminações residuais

Os contaminantes são eficazmente lavados com o Wash Buffer R1 e R2, enquanto o ARN permanece ligado à membrana.

6. Eluição de ARN

O ARN total é eluído do RNA-RTA Spin Filter utilizando 30 - 100 µl de Elution Buffer R.

3. Extração de ácidos nucleicos com o InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit

3.1 Antes de iniciar um protocolo

Quando utilizar o kit pela primeira vez, certifique-se de que todos os tampões e reagentes estão preparados conforme indicado:

Preparações de tampão antes da primeira utilização: 50 preparações
Lysis Solution TR, preparar sempre a quantidade necessária fresca antes da utilização (mais detalhe em baixo): Transferir o volume necessário para um frasco/tubo separado e adicionar 1/100 de volume de DTT 1 M.
Wash Buffer R1: Adicionar 20 ml de etanol a 96-100% à garrafa. Misturar bem, mantendo a garrafa sempre bem fechada.
Wash Buffer R2: Adicionar 48 ml de etanol a 96-100% a cada garrafa. Misturar bem, mantendo a garrafa sempre bem fechada.
Concentrated Buffer EL: Adicionar 970 ml de água livre de DNase/RNase numa garrafa vazia e limpa. Adicionar a quantidade total (30 ml) de Buffer EL concentrate e misturar bem. Rotular o frasco com Buffer EL , armazenar o Buffer EL a 2-8°C.
Preparações de tampão antes da primeira utilização: 250 preparações
Lysis solution TR, preparar sempre a quantidade necessária fresca antes da utilização (mais detalhe em baixo): Transferir o volume necessário para um frasco/tubo separado e adicionar 1/100 de volume de DTT 1 M.
Wash Buffer R1: Adicionar 80 ml de etanol a 96-100% à garrafa. Misturar bem, mantendo a garrafa sempre bem fechada.
Wash Buffer R2: Adicionar 160 ml de etanol a 96-100% a cada garrafa. Misturar bem, mantendo a garrafa sempre bem fechada.
Concentrated Buffer EL: Colocar 970 ml de água livre de DNase/RNase numa garrafa vazia e limpa. Adicionar a quantidade total (30 ml) de um Buffer EL concentrate e misturar bem. Rotular o frasco com Buffer EL , armazenar o Buffer EL a 2-8°C.

- Arrefecer o Buffer EL a 2-8°C (o Buffer EL só é necessário para o isolamento de ARN de amostras de sangue e não para outros tipos de amostras)
- Determinar o número de reações necessárias, incluindo os controlos, e rotular a quantidade necessária de RTA Spin Filters (tampa) e a quantidade necessária de 1.5 ml Receiver Tubes (por amostra: é necessário 1 Receiver Tube).

Preparação da Lysis Solution TR

É necessário adicionar DTT (ou, opcionalmente, β -Mercaptoetanol) à Lysis Solution TR. Devido à instabilidade do DTT dissolvido, preparar sempre a Lysis Solution TR com DTT fresco e pouco tempo antes da utilização.

Antes de utilizar, agitar sempre suavemente a Lysis Solution TR para assegurar uma distribuição uniforme da matriz de transporte mineral de ligação ao ADN na solução. Esperar brevemente até que a espuma que se formou tenha desaparecido.

Determinar o número de reações necessárias, incluindo quaisquer controlos que se queira adicionar. Recomenda-se a preparação de um volume que exceda o número total de preparações em 5 %. O volume necessário de Lysis Solution TR pode ser encontrado no protocolo para o respetivo material de amostra inicial.

Transferir a quantidade necessária de Lysis Solution TR para um frasco separado adequado ao volume total necessário, por exemplo, um tubo de 15 ml.

Adicionar 1/100 de volume de DTT ao volume necessário de Lysis Solution TR. Opcionalmente, o DTT pode ser substituído por 1/100 de volume de β -Mercaptoetanol.

3.2 Amostragem e armazenamento do material inicial

Armazenar as amostras corretamente é fundamental para garantir rendimentos reprodutíveis e elevados. Os rendimentos podem variar em função de fatores como a saúde do dador, a idade e tipo de amostra, as condições de transporte e a conservação.

Devem evitar-se ciclos repetidos de congelação-descongelação das amostras para prevenir a degradação dos ácidos nucleicos. Recomenda-se que sejam tidas em conta orientações técnicas como as normas CEN/TS e ISO sobre o processo de pré-exame para diagnósticos moleculares no âmbito do Regulamento Europeu de Dispositivos Médicos de Diagnóstico in Vitro (IVDR), conforme salientado em G. Dagher, et al. (<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.05.002>).

Cultura celular: Para evitar a degradação do ARN, a extração de ácidos nucleicos deve ser realizada imediatamente após a colheita. Para uma extração posterior, as células devem ser congeladas em azoto líquido imediatamente após a colheita, permitindo armazená-las a -80°C durante vários meses. O material inicial também pode ser armazenado em Lysis Solution TR contendo DTT a -80°C após a lise das células.

Amostras de tecido: As amostras devem ser imediatamente ultracongeladas após a colheita e armazenadas a -80°C ou a purificação do ARN deve ser efetuada imediatamente. O ARN de amostras ultracongeladas é estável durante meses. O tecido congelado não deve descongelar durante o manuseamento. O material inicial também pode ser armazenado na Lysis Solution TR contendo DTT a -80°C após a lise celular.

Tecido incluído em parafina tratado com formalina: Os procedimentos de fixação com formalina e de inclusão em parafina, de acordo com os protocolos padrão, causam frequentemente uma degradação dos ácidos nucleicos. O ARN só pode ser isolado com êxito das secções se a formalina tiver um pH ajustado (pH 7-8), se a amostra for fresca e se tiver sido armazenada corretamente. As secções devem ser sempre armazenadas num local fresco e seco, devendo evitar-se temperaturas elevadas e humidade. As secções não devem ser armazenadas durante mais de 8 semanas, uma vez que o ARN contido nas secções é muito instável. O ARN é mais bem conservado em blocos não cortados. É igualmente importante

garantir que a amostra foi fixada corretamente e que não contém qualquer água residual, por exemplo.

Sangue: As amostras de sangue (estabilizadas com EDTA ou citrato, mas não heparinizadas) devem ser armazenadas em gelo imediatamente após a colheita para reduzir as atividades reguladoras do ARN na amostra. Não utilizar amostras congeladas, apenas amostras frescas para purificação. Os leucócitos devem ser isolados no prazo de 4 horas após a colheita e podem depois ser armazenados a -80°C. Os leucócitos também podem ser armazenados em Lysis Solution TR contendo DTT: em gelo até 1 dia ou a -20°C até 5 dias.

3.3 Preparação dos materiais iniciais

De seguida, descreve-se o pré-tratamento dos diferentes tipos de amostra.

Após a preparação dos materiais de partida, consultar o protocolo de extração de ácido nucleico específico da amostra correspondente.

3.3.1 Cultura celular

a) Células cultivadas em suspensão

Centrifugar até 1×10^7 células durante 5 minutos a 240 x g. Não exceder uma contagem de células de 1×10^7 células, recomenda-se a contagem de células. Remover completamente o sobrenadante e continuar com a lise da amostra conforme descrito no protocolo 1.

b) Células cultivadas em monocamada

Em recipientes de cultura grandes (placas >Ø 35 mm, frascos > 12,5 cm²), separar as células por tripsinização. Transferir as células para um tubo de centrifugação e sedimentar durante 5 minutos a 250 x g. Remover completamente o sobrenadante.

Em pequenos recipientes de cultura (placas de 96, 24, 12, 6 poços, placas de Ø 35 mm, frascos de 12,5 cm²), deitar completamente fora o meio de cultura e continuar imediatamente com a lise, tal como descrito no protocolo 1.

Após a lise, o material inicial pode ser armazenado em Lysis Solution TR contendo DTT a -20°C durante um máximo de 5 dias ou durante mais tempo a -80°C. Para proceder à extração de ácidos nucleicos, os lisados congelados devem ser incubados num banho de água a 37°C até estarem completamente descongelados, pouco antes da extração. Deve evitar-se uma incubação prolongada, uma vez que pode comprometer a integridade do ARN.

3.3.2 Amostras de tecido

Para obter um rendimento máximo de ARN total, é necessário efetuar uma rutura e homogeneização completas das amostras de tecido.

Uma rutura e homogeneização incompletas conduzem a uma redução significativa do rendimento e podem provocar a obstrução do filtro de centrifugação RNA-RTA. A homogeneização com um moinho de esferas, etc., resulta geralmente num maior rendimento de ARN.

a) Homogeneização utilizando zirconia beads e um moinho de esferas ou agitador vortex

Transferir 1 - 20 mg de amostra de tecido fresco ou congelado para um frasco adequado para o homogeneizador e adicionar Zirconia Beads. Recomenda-se uma mistura de Zirconia Beads, 6 x Zirconia Beads I e 3 x Zirconia Beads II. A proporção e o número total de Zirconia Beads I e II podem ter de ser ajustados de acordo com o tipo e a quantidade de tecido.

Agitar suavemente a Lysis Solution TR contendo DTT antes de utilizar, evitando a formação de espuma por pipetagem.

Tecido com conteúdo de ácido nucleico baixo a moderado: Adicionar 600 µl de Lysis Solution TR contendo DTT e homogeneizar a amostra.

Tecido com elevado teor de ácidos nucleicos, como baço, rim, pulmão: Adicionar 900 µl de Lysis Solution TR contendo DTT e homogeneizar a amostra.

Transferir a amostra para um 2.0 ml Receiver Tube e iniciar a extração de ARN, seguindo o protocolo 2. Opcionalmente, a amostra pode ser armazenada a -20°C até à extração.

b) Homogeneização com almofariz e pilão

Congelar 1-20 mg de amostra de tecido em azoto líquido e triturar até obter um pó fino. Transferir o pó para um 2.0 ml Receiver Tube. Deixar evaporar o azoto líquido, mas não deixar descongelar a amostra.

Agitar suavemente a Lysis Solution TR contendo DTT antes de utilizar, evitando a formação de espuma por pipetagem.

Tecido com conteúdo de ácido nucleico baixo a moderado: Adicionar 600 µl de Lysis Solution TR contendo DTT.

Tecido com elevado teor de ácidos nucleicos, como baço, rim, pulmão: Adicionar 900 µl de Lysis Solution TR contendo DTT.

Seguir o protocolo 2. Opcionalmente, a amostra pode ser armazenada a -20°C até à extração.

3.3.3 Tecidos incluídos em parafina tratados com formalina (cortes de parafina)

Recomenda-se a utilização de secções recém-cortadas com uma espessura máxima de 10 µm. Não aplicar mais de 8 secções com uma área de superfície de 250 mm² numa única passagem de purificação. No caso de tecidos com um elevado teor de ácidos nucleicos (por exemplo, timo), utilizar menos secções por preparação para evitar sobrecarregar a coluna. Para estabelecer o número de secções utilizadas numa preparação, recomendamos que se comece com uma ou duas secções. Note-se que o teor de ARN dos cortes de parafina é muito variável e que o ARN é degradado pelo tratamento com formalina.

Transferir as fatias de parafina para um tubo de reação de 1,5 ml e adicionar 0,5 ml de octano ou xileno. Agitar cuidadosamente no vortex para dissolver a parafina.

Centrifugar durante 2 minutos à velocidade máxima para sedimentar o tecido. Descartar o sobrenadante com muito cuidado. Este passo deve ser repetido se ainda for visível alguma parafina na amostra. Quando a amostra de tecido parecer transparente, efetuar uma lavagem final com etanol a 96-100%.

Para secar a amostra, centrifugar rapidamente e remover o etanol. Incubar o tubo de reação aberto a 52°C até à evaporação do etanol restante.

Adicionar 10 µl de Proteinase K (40 mg/ml) e 90 µl de RNase free TE-Buffer (50 mM TrisCl pH 8 com 10 mM EDTA) contendo 10 mM DTT à amostra, misturar completamente pipetando para cima e para baixo e incubar durante 10 min a 48°C. Recomenda-se a trituração mecânica ou o corte do material antes ou durante a lise.

Para a Proteinase K, ter igualmente em conta as recomendações do fabricante; este protocolo dá um exemplo para uma solução-mãe de 40 mg/ml.

Incubar durante 10 minutos com agitação constante a 80 °C para inverter parcialmente a reticulação dos ácidos nucleicos libertados com formalina e para melhorar o rendimento e a qualidade do ARN.

Adicionar 600 µl de Lysis Solution TR contendo DTT e continuar com o passo 2, protocolo 2.

3.3.4 Sangue

O pré-tratamento das amostras de sangue total é descrito no protocolo 3. Deve ser efetuada uma separação celular para células nucleadas, pelo que não podem ser utilizadas amostras congeladas.

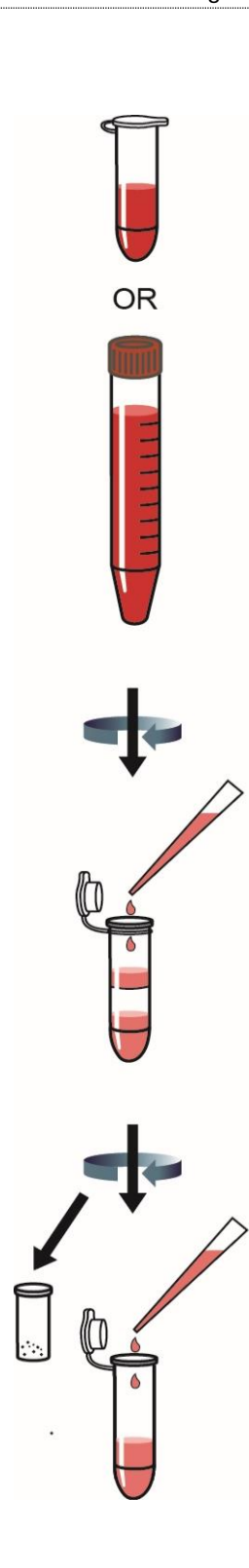
Se a sua amostra já tiver leucócitos separados (camada leucoplaquetária, Ficoll® density-gradient, e afins), siga o protocolo 1, que descreve o processamento de culturas de células. Os leucócitos devem ser utilizados frescos ou congelados a -80°C, descongelar os pellets de leucócitos adicionando Lysis Solution TR contendo DTT.

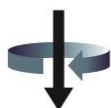
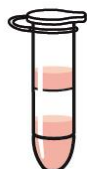
3.4 Protocolo curto InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit

Lise das amostras

Consultar o capítulo 3.3 das instruções de utilização para o pré-tratamento específico da amostra

Agite suavemente a Lysis Solution TR contendo DTT antes de utilizar, evite pipetar a espuma

	Cultura celular	1a). <u>Lise das células em pellets</u> Soltar o pellet de células sacudindo o tubo - Para $< 5 \times 10^6$ células: adicionar 350 µl de Lysis Solution TR contendo DTT - Para $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ células: adicionar 700 µl de Lysis Solution TR contendo DTT Misturar bem, pipetando para cima e para baixo. 1b). <u>Lise das células em monocamada</u> - Para placas de 96, 24 e 12 poços: adicionar 350 µl de Lysis Solution TR contendo DTT. - Para placas de 6 poços; placas de Ø 35 mm; frascos de células de 12,5 cm²: adicionar 700 µl de Lysis Solution TR contendo DTT Recolher o lisado celular com um policarpo de borracha. Misturar bem, pipetando para cima e para baixo.
		1. Desfazer e homogeneizar a amostra como descrito no capítulo 3.3: - Amostras com baixo/médio teor de ácido nucleico: adicionar 600 µl de Lysis Solution TR contendo DTT - Amostras com elevado teor de ácidos nucleicos: adicionar 900 µl de Lysis Solution TR contendo DTT Transferir a amostra para um 2.0 ml Receiver Tube
	Sangue	1. Inverter a amostra de sangue 15 vezes, não agitar em vórtex! Transferir 0,5-1,5 ml para um tubo de 15 ml e adicionar 10 ml de Buffer EL frio (2-8°C). Misturar por inversão. Incubar durante 15 minutos em gelo, inverter 2 vezes durante a incubação. Centrifugar durante 5 min, a 4°C, a 960 x g. Retirar o sobrenadante e adicionar 5 ml de Buffer EL frio (2-8°C), ressuspender batendo com o dedo. Centrifugar durante 5 min, 4°C a 960 x g. Remover o sobrenadante, deixando um pellet branco. Adicionar 900 µl de Lysis Solution TR contendo DTT. Ressuspender por pipetagem.
	Cultura celular	Ligação e remoção de ADN 2. Colocar um DNA-Binding Spin Filter num 2.0 ml Receiver Tube, transferir todo o lisado, incluindo qualquer precipitado. Incubar durante 1 min. Centrifugar durante 2 minutos a 11.000 x g. Descartar o DNA-Binding Spin Filter. - Para $< 5 \times 10^6$ células: adicionar 250 µl de etanol a 70%. - Para $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ células: adicionar 500 µl de etanol a 70%. Misturar bem, pipetando para cima e para baixo
		2. Centrifugar durante 2 minutos à velocidade máxima. - Amostras com baixo/médio teor de ácido nucleico: transferir 500 µl de sobrenadante para um novo 2.0 ml Receiver Tube, adicionar 330 µl de etanol a 96-100% - Amostras com elevado teor de ácido nucleico: transferir 800 µl de sobrenadante para um novo 2.0 ml Receiver Tube, adicionar 500 µl de etanol a 96-100% Misturar bem, pipetando para cima e para baixo.
	Sangue	2. Transferir a mistura de amostras para um 2.0 ml Receiver Tube, agitar durante 10 segundos Incubar durante 5 minutos, agitar no vórtex 3-5 vezes durante a incubação. Centrifugar durante 1 minuto a 11.000 x g. Transferir o sobrenadante para um novo 2.0 ml Receiver Tube. Adicionar 750 µl de etanol a 96-100% e misturar com uma pipeta.



Ligação do ARN

3. Transferir toda a amostra (até 700 µl) para um RNA-RTA Spin Filter Set Spin Incubar durante 1 min.
Centrifugar durante 1 minuto a 11.000 x g.
Descartar o filtrado e voltar a colocar o RNA-RTA Spin Filter no RTA Receiver Tube.
Repetir a operação se o volume de amostra exceder 700 µl.

Lavagem para remoção contaminações residuais

4. Adicionar 600 µl de **Wash Buffer R1**, centrifugar durante 1 min a 11.000 x g
Descartar o RTA Receiver Tube com o filtrado e colocar o filtro de centrifugação RNA-RTA num novo RTA Receiver Tube .
5. Adicionar 700 µl de **Wash Buffer R2**, centrifugar durante 1 min a 11.000 x g
Eliminar o filtrado e voltar a colocar o RNA-RTA Spin Filter no RTA Receiver Tube.
6. Repetir este passo de lavagem (5.) uma vez.
7. Centrifugar durante 4 minutos à velocidade máxima para remover o etanol residual.
Descartar o RTA Receiver Tube com o filtrado.

Eluição do ARN

Cultura celular	8. Colocar o RNA-RTA Spin Filter num 1.5 ml Receiver Tube. Adicionar 30-100 µl de Elution Buffer R diretamente ao RNA-RTA Spin Filter. Incubar durante 2 minutos e centrifugar 1 minuto a 11.000 x g. Eliminar o RTA Spin Filter e armazenar o ARN eluído em gelo
Tecido	8. Colocar o RNA-RTA Spin Filter num 1.5 ml Receiver Tube. Adicionar 30-60 µl de Elution Buffer R diretamente ao RNA-RTA Spin Filter. Incubar durante 2 minutos e centrifugar 1 minuto a 11.000 x g. Eliminar o RTA Spin Filter e armazenar o ARN eluído em gelo
Sangue	8. Colocar o RNA-RTA Spin Filter num 1.5 ml Receiver Tube. Adicionar 30-60 µl de Elution Buffer R diretamente ao RNA-RTA Spin Filter. Incubar durante 2 minutos e centrifugar 1 minuto a 11.000 x g. Eliminar o RTA Spin Filter e armazenar o ARN eluído em gelo

3.5 Protocolo 1: Extração de ARN total de culturas celulares

Consultar o capítulo 3.3 "Preparação do material inicial" para o pré-tratamento específico da amostra.

Agitar suavemente a Lysis Solution TR contendo DTT antes de utilizar, evitando pipetar espuma.

1.a) Lise de amostras de células em pellets

Soltar o pellet de células rodando o tubo.

- Para $< 5 \times 10^6$ células: adicionar 350 µl de **Lysis Solution TR contendo DTT**.
- Para $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ células: adicionar 700 µl de **Lysis Solution TR contendo DTT**.

Misturar bem, pipetando para cima e para baixo. Não devem ser visíveis quaisquer aglomerados de células antes de prosseguir para a etapa seguinte.

1.b) Lise de amostras de células em monocamada

- Para placas de 96, 24 e 12 poços: adicionar 350 µl de **Lysis Solution TR contendo DTT**.
- Para placas de 6 poços; placas de Ø 35 mm; frascos de células de 12,5 cm²: adicionar 700 µl de **Lysis Solution TR contendo DTT**.

Recolher o lisado celular com um polícarpo de borracha. Misturar bem, pipetando para cima e para baixo. Não devem ser visíveis quaisquer aglomerados de células antes de prosseguir para a etapa seguinte.

2. Colocar um DNA-Binding Spin Filter num 2.0 ml Receiver Tube (com tampa). Transferir todo o lisado, incluindo qualquer precipitado que se possa ter formado, para o DNA-Binding Spin Filter

Incubar durante 1 min.

Centrifugar durante 2 minutos a 11.000 x g.

Descartar o DNA-Binding Spin Filter.

- Para $< 5 \times 10^6$ células: adicionar 250 µl de **etanol a 70%** ao lisado.
- Para $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ células: adicionar 500 µl de **etanol a 70%** ao lisado.

Misturar bem, pipetando para cima e para baixo.

3. Transferir toda a amostra (até 700 µl) para um RNA-RTA Spin Filter Set.

Incubar durante 1 min.

Centrifugar durante 1 minuto a 11.000 x g.

Descartar o filtrado e voltar a colocar o RNA-RTA Spin Filter no RTA Receiver Tube .

Se o volume da amostra for superior a 700 µl, separar o carregamento do RNA-RTA Spin Filter em duas etapas e repetir os passos.

4. Adicionar 600 µl de **Wash Buffer R1** ao RNA-RTA Spin Filter e centrifugar durante 1 min a 11.000 x g.

Descartar o RTA Receiver Tube com o filtrado e colocar o filtro de centrifugação RNA-RTA num novo RTA Receiver Tube .

5. Adicionar 700 µl de **Wash Buffer R2** ao RNA-RTA Spin Filter e centrifugar durante 1 min a 11.000 x g.

Eliminar o filtrado e voltar a colocar o RNA-RTA Spin Filter no RTA Receiver Tube.

6. Adicionar 700 µl de **Wash Buffer R2** ao RNA-RTA Spin Filter e centrifugar durante 1 min a 11.000 x g.

Eliminar o filtrado e voltar a colocar o RNA-RTA Spin Filter no RTA Receiver Tube.

7. Centrifugar durante 4 minutos à velocidade máxima para eliminar completamente o etanol. Descartar o RTA Receiver Tube com o filtrado.
8. Colocar o RNA-RTA Spin Filter num 1.5 ml Receiver Tube sem RNase.
Adicionar 30 - 100 µl de **Elution Buffer R** diretamente na superfície do RNA-RTA Spin Filter.
Incubar durante 2 minutos e centrifugar durante 1 minuto a 11.000 x g.
Deite fora o filtro de centrifugação RTA.
Fechar o 1.5 ml Receiver Tube e armazenar imediatamente o ARN eluído em gelo. Utilizar diretamente para análise ou congelar a -80°C.

3.6 Protocolo 2: Extração do ARN total do tecido

Consultar o capítulo 3.3 "Preparação do material inicial" para o pré-tratamento específico da amostra.

Trabalhe rapidamente e efetue todos os passos à temperatura ambiente.

Agitar suavemente a Lysis Solution TR contendo DTT antes de utilizar, evitando pipetar espuma.

1. Desfazer e homogeneizar a amostra como descrito no capítulo 3.3:

- Amostras com teor de ácido nucleico baixo/moderado: adicionar 600 µl de **Lysis Solution TR contendo DTT**
- Amostras com elevado teor de ácidos nucleicos: adicionar 900 µl de **Lysis Solution TR contendo DTT**

Transferir toda a mistura da amostra para um 2.0 ml Receiver Tube .

2. Centrifugar o 2.0 ml Receiver Tube com o lisado durante 2 minutos à velocidade máxima.

- Amostras com teor de ácido nucleico baixo/moderado: Transferir 500 µl do sobrenadante (sem Zirconia Beads) para um novo 2.0 ml Receiver Tube , adicionar 330 µl de **etanol a 96-100%** e misturar bem pipetando para cima e para baixo.
- Amostras com elevado teor de ácido nucleico: Transferir 800 µl do sobrenadante (sem zirconia beads) para um novo 2.0 ml Receiver Tube, adicionar 500 µl de **etanol a 96-100%** e misturar bem pipetando para cima e para baixo.

3. Transferir 700 µl para um RNA-RTA Spin Filter Set.

Incubar durante 1 min.

Centrifugar durante 2 minutos a 11.000 x g.

Descartar o filtrado e colocar o RNA-RTA Spin Filter de volta no RTA Receiver Tube .

Se o volume da amostra for superior a 700 µl, separar o carregamento do RNA-RTA Spin Filter em duas etapas e repetir os passos.

4. Adicionar **600 µl de Wash Buffer R1** ao RNA-RTA Spin Filter e centrifugar durante 1 min a 11.000 x g.

Descartar o RTA Receiver Tube com o filtrado e colocar o filtro de centrifugação RNA-RTA num novo RTA Receiver Tube .

5. Adicionar **700 µl de Wash Buffer R2** ao RNA-RTA Spin Filter e centrifugar durante 1 min a 11.000 x g.

Eliminar o filtrado e voltar a colocar o RNA-RTA Spin Filter no RTA Receiver Tube.

6. Adicionar 700 µl de **Wash Buffer R2** ao RNA-RTA Spin Filter e centrifugar durante 1 min a 11.000 x g.

Eliminar o filtrado e voltar a colocar o RNA-RTA Spin Filter no RTA Receiver Tube.

7. Centrifugar durante 4 minutos à velocidade máxima para eliminar completamente o etanol. Descartar o RTA Receiver Tube com o filtrado.

8. Colocar o RNA-RTA Spin Filter num RNase free 1.5 ml Receiver Tube

Adicionar 30 - 60 µl de **Elution Buffer R** diretamente na superfície do RNA-RTA Spin Filter.

Incubar à temperatura ambiente durante 2 minutos e centrifugar durante 1 minuto a 11.000 x g.

Descarte o RTA Spin Filter.

Fechar o 1.5 ml Receiver Tube e armazenar imediatamente o ARN eluído em gelo. Utilizar diretamente para análise ou congelar a -80°C.

3.7 Protocolo 3: Extração de ARN total do sangue total

Consultar o capítulo 3.3 "Preparação do material inicial" para o pré-tratamento específico da amostra.

1. Inverter cuidadosamente as amostras de sangue fresco 15 vezes para homogeneizar a amostra, não agitar em vórtex!
Transferir 0,5 - 1,5 ml (máx. 1×10^7 leucócitos) para um tubo de 15 ml.
Adicionar 10 ml de **Buffer EL** frio (2-8°C). Misturar invertendo cuidadosamente.
Incubar durante 15 minutos em gelo. Misturar invertendo duas vezes durante a incubação.

Nota: *A suspensão turva torna-se translúcida durante a incubação, indicando a lise dos eritrócitos. Se necessário, o tempo de incubação pode ser alargado para 20 minutos.*

Centrifugar durante 5 minutos e a 4°C a 960 x g.

Retirar o sobrenadante completamente e com muito cuidado (os leucócitos formam um pellet visível).

Adicionar 5 ml de **Buffer EL** frio (2-8°C), ressuspender o sedimento cortando-o com o dedo.

Centrifugar durante 5 minutos e a 4°C a 960 x g.

Remover o sobrenadante tão completamente quanto possível, incluindo os glóbulos vermelhos remanescentes.

Nota: *A remoção incompleta do sobrenadante irá interferir com a lise e a subsequente ligação do ARN ao RNA-RTA Spin Filter, resultando num rendimento e pureza inferiores.*

Adicionar 900 µl de **Lysis Solution TR com DTT**. Agitar suavemente a Lysis Solution TR contendo DTT antes de utilizar, evitando pipetar espuma.

Pipetar várias vezes para cima e para baixo para ressuspender completamente o sedimento.

2. Transferir a mistura de amostras para um 2.0 ml Receiver Tube, agitar durante 10 segundos.
Incubar durante 5 minutos, agitar no vórtex 3 a 5 vezes durante a incubação.
Centrifugar durante 1 minuto a 11.000 x g (será visível um sedimento gelatinoso).
Transferir o sobrenadante para um novo 2.0 ml Receiver Tube, evitando a transferência do sedimento.

Adicionar 750 µl de **etanol a 96-100%** e misturar bem, pipetando para cima e para baixo (pode aparecer um precipitado que não afectará o procedimento).
3. Transferir 700 µl da mistura para um RNA-RTA Spin Filter Set.
Incubar durante 1 min.
Centrifugar durante 1 minuto a 11.000 x g.
Descartar o filtrado e colocar o RNA-RTA Spin Filter de volta no RTA Receiver Tube .
Repetir os passos para o restante volume de amostra.
4. Adicionar **600 µl de Wash Buffer R1** ao RNA-RTA Spin Filter e centrifugar durante 1 min a 11.000 x g.
Descartar o filtrado e colocar o RNA-RTA Spin Filter num novo RTA Receiver Tube .
5. Adicionar **700 µl de Wash Buffer R2** ao RNA-RTA Spin Filter e centrifugar durante 1 min a 11.000 x g.
Eliminar o filtrado e voltar a colocar o RNA-RTA Spin Filter no RTA Receiver Tube.

6. Adicionar 700 µl de **Wash Buffer R2** ao RNA-RTA Spin Filter e centrifugar durante 1 min a 11.000 x g. Eliminar o filtrado e voltar a colocar o RNA-RTA Spin Filter no RTA Receiver Tube.
7. Centrifugar durante 4 minutos à velocidade máxima para eliminar completamente o etanol. Descartar o RTA Receiver Tube com o filtrado.
8. Colocar o RNA-RTA Spin Filter num RNase free 1.5 ml Receiver Tube
Adicionar 30 - 60 µl de **Elution Buffer R** diretamente na superfície do RNA-RTA Spin Filter.
Incubar à temperatura ambiente durante 2 minutos e centrifugar durante 1 minuto a 11.000 x g.
Eliminar o RTA Spin Filter. Fechar o 1.5 ml Receiver Tube e armazenar imediatamente o ARN eluído em gelo. Utilizar diretamente para análise ou congelar a -80°C.

3.8 Protocolo suplementar (RUO): Isolamento simultâneo de ADN e ARN

Nota: O **Wash Buffer R1** e **R 2**, bem como os 2,0 ml Receiver Tubes e os 1,5 ml Receiver Tubes para purificação do ARN fornecidos com o kit, são calculados para o isolamento do ARN. A quantidade fornecida não inclui os tampões e o plástico necessários para o isolamento simultâneo de ADN e ARN.

Modificação do Protocolo 1: Isolamento de ADN de culturas celulares

1. Efetuar a lise da amostra conforme descrito no Protocolo 1, passo 1.
2. Colocar um DNA-Binding Spin Filter num 2.0 ml Receiver Tube (com tampa). Transferir todo o lisado, incluindo qualquer precipitado que se possa ter formado, para o DNA-Binding Spin Filter.
Incubar 1 min.
Centrifugar 2 minutos a 11.000 x g.

Isolamento do ARN: proceder como descrito no Protocolo 1, etapa 3.
Isolamento do ADN: Transferir o DNA-Binding Spin Filter para um novo 2.0 ml Receiver Tube
3. Adicionar 600 µl de **Wash Buffer R1** ao DNA-Binding Spin Filter e centrifugar durante 1 min a 11.000 x g.
Descartar o Receiver Tube com o filtrado e colocar o DNA-Binding Spin Filter num novo 2.0 ml Receiver Tube.
4. Adicionar 700 µl de **Wash Buffer R2** ao DNA-Binding Spin Filter e centrifugar durante 1 min a 11 000 x g. Descartar o filtrado e voltar a colocar o DNA-Binding Spin Filter no 2.0 ml Receiver Tube.
5. Repetir o passo de lavagem com o Wash Buffer R2 uma vez.
6. Eliminar o filtrado e voltar a colocar o DNA-Binding Spin Filter no 2.0 ml Receiver Tube utilizado. Centrifugar durante 4 minutos à velocidade máxima para eliminar completamente o etanol.
Descartar o 2.0 ml Receiver Tube com o filtrado.
7. Colocar o DNA-Binding Spin Filter num 1.5 ml Receiver Tube.
Adicionar 50 - 100 µl de **Elution Buffer R** ou **água livre de DNase/RNase** diretamente na superfície do DNA-Binding Spin Filter.
Incubar durante 2 minutos e centrifugar durante 1 minuto a 11.000 x g.
Descartar o DNA-Binding Spin Filter.
Fechar o Tubo Recetor de 1,5 ml, utilizar diretamente o ADN para análise ou armazenar adequadamente.

Modificação do Protocolo 2: Isolamento de ADN de amostras de tecidos

1. Preparar a amostra conforme descrito no capítulo 3.3 "Preparação do material inicial", utilizando um moinho de esferas ou um almofariz e pilão para homogeneizar a amostra. De acordo com o tipo de tecido, adicionar 600 µl ou 900 µl de **Lysis Solution TR contendo DTT**, conforme descrito.
2. Centrifugar o 2.0 ml Receiver Tube que contém o lisado de tecido durante 2 minutos à velocidade máxima.
Isolamento do ARN: De acordo com o tipo de tecido, transferir 500 µl do sobrenadante para um novo 2.0 ml Receiver Tube e adicionar 330 µl de **etanol a 96-100% OU** transferir 800 µl do sobrenadante para um novo 2.0 ml Receiver Tube e adicionar 500 µl de **etanol a 96-100%**. Misturar bem, pipetando para cima e para baixo. Proceder como descrito no Protocolo 2, etapa 3.

Isolamento do ADN: certificar-se de que remove completamente o sobrenadante residual e adicionar 600 µl de **Wash Buffer R1** ao sedimento, ressuspender pipetando para cima e para baixo.

3. Colocar um DNA-Binding Spin Filter num novo 2.0 ml Receiver Tube (com tampa). Transferir a amostra sem as zirconia beads para o DNA-Binding Spin Filter. Centrifugar 1 min a 11.000 x g. Eliminar o filtrado e voltar a colocar o DNA-Binding Spin Filter no 2.0 ml Receiver Tube.
4. Adicionar 700 µl de **Wash Buffer R2** ao DNA-Binding Spin Filter e centrifugar durante 1 min a 11 000 x g. Descartar o filtrado e voltar a colocar o DNA-Binding Spin Filter no 2.0 ml Receiver Tube.
5. Repetir o passo de lavagem com o **Wash Buffer R2** uma vez.
6. Eliminar o filtrado e voltar a colocar o DNA-Binding Spin Filter no 2.0 ml Receiver Tube. Centrifugar durante 4 minutos à velocidade máxima para eliminar completamente o etanol. Descartar o 2.0 ml Receiver Tube com o filtrado.
7. Colocar o DNA-Binding Spin Filter num 1.5 ml Receiver Tube. Adicionar 50 - 100 µl de **Elution Buffer R** ou **água isenta de DNase/RNase** diretamente na superfície do DNA-Binding Spin Filter. Incubar durante 2 minutos e centrifugar durante 1 minuto a 11.000 x g. Descartar o DNA-Binding Spin Filter. Fechar o 1.5 ml Receiver Tube, utilizar diretamente o ADN para análise ou armazenar adequadamente.

Modificação do Protocolo 3: Isolamento de ADN de amostras de sangue

1. Efetuar a etapa 1 como descrito no Protocolo 3.
2. Transferir a mistura de amostras para um 2.0 ml Receiver Tube e agitar durante 10 segundos. Incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente, agitar no vórtex 3 a 5 vezes durante a incubação. Transferir a amostra para um DNA-Binding Spin Filter colocado num 2.0 ml Receiver Tube (com tampa), incubar durante 1 min. Centrifugar durante 2 minutos a 11.000 x g, o eluato contém o ARN total.
Isolamento do ADN: Transferir o DNA-Binding Spin Filter para um novo 2.0 ml Receiver Tube.
3. Adicionar 600 µl de **Wash Buffer R1** ao DNA-Binding Spin Filter e centrifugar durante 1 min a 11.000 x g.
4. Eliminar o tubo recetor com o filtrado e colocar o DNA-Binding Spin Filter num novo 2.0 ml Receiver Tube. Adicionar 700 µl de **Wash Buffer R2** ao DNA-Binding Spin Filter e centrifugar durante 1 min a 11 000 x g. Eliminar o filtrado e voltar a colocar o DNA-Binding Spin Filter no 2.0 ml Receiver Tube.
5. Repetir o passo de lavagem com o **Wash Buffer R2** uma vez.
6. Eliminar o filtrado e voltar a colocar o DNA-Binding Spin Filter no 2.0 ml Receiver Tube. Centrifugar durante 4 minutos à velocidade máxima para eliminar completamente o etanol. Descartar o 2.0 ml Receiver Tube.
7. Colocar o DNA-Binding Spin Filter num 1.5 ml Receiver Tube. Adicionar 50 - 100 µl de **Elution Buffer R** ou **água livre de DNase/RNase** diretamente na superfície do filtro Spin Filter de ligação ao ADN. Incubar durante 2 minutos e centrifugar durante 1 minuto a 11.000 x g.

Descartar o DNA-Binding Spin Filter.
Fechar o 1.5 ml Receiver Tube, utilizar diretamente o ADN para análise ou armazenar adequadamente.

3.9 Protocolo suplementar (RUO): Digestão do ADN no RNA-RTA Spin Filter

Recomenda-se a digestão adicional com DNase, se necessário, para aplicações posteriores, como RT-qPCR, em que pequenas quantidades de ADN podem interferir. A digestão com DNase pode ser efetuada diretamente no filtro spin e pode ser integrada no segundo passo de lavagem.

Para modificar o protocolo do respetivo tipo de amostra, consultar a etapa em que é utilizado o Wash Buffer R2 (etapa 5) e proceder da seguinte forma:

1. Adicionar 600 µl de **Wash Buffer R2** ao RNA-RTA Spin Filter e centrifugar 30 segundos a 10.000 x g.
2. Descartar o filtrado e voltar a colocar o RNA-RTA Spin Filter no RTA Receiver Tube utilizado.
3. Adicionar 10 µl de uma mistura de reação de DNase diretamente na superfície do filtro Spin RNA-RTA.
Uma mistura de reação típica é, por exemplo, 1 µl de enzima DNase I (50 U) em 9 µl de tampão de reação 1 x DNase (siga os conselhos do respetivo fabricante para a aplicação correcta da DNase!). Não exceder o volume da mistura de reação para mais de 10 µl!
4. Incubar o RNA-RTA Spin Filter à temperatura ambiente durante 10 minutos.
5. Adicionar 600 µl de **Wash Buffer R2** ao RNA-RTA Spin Filter, incubar durante 1 minuto e centrifugar durante 1 minuto a 11.000 x g. Eliminar o filtrado e voltar a colocar o RNA-RTA Spin Filter no RTA Receiver Tube.
6. Repetir a segunda etapa de lavagem mais uma vez.
7. Prosseguir o protocolo com a remoção do etanol e a eluição dos ácidos nucleicos.

3.10 Protocolo suplementar (RUO): Extração de ARN da fase aquosa de Trizol

1. Adicionar um volume igual de **Lysis Solution TR contendo DTT** a 350 µl da fase aquosa de Trizol num 2.0 ml Receiver Tube. Misturar bem, pipetando para cima e para baixo.
Incubar durante 1 min.
Centrifugar 2 min a 11.000 x g
2. Transferir o sobrenadante para um novo 2.0 ml Receiver Tube, descartar o pellet.
3. Adicionar 1 volume de **etanol a 96-100%** e misturar bem, pipetando para cima e para baixo.
4. Transferir toda a mistura para um RNA-RTA Spin Filter Set.
Incubar 1 min.
Centrifugar 1 minuto a 11.000 x g.

Eliminar o filtrado e voltar a colocar o RNA-RTA Spin Filter no RTA Receiver Tube.
Se o volume da amostra for superior a 700 µl, separar o carregamento do RNA-RTA Spin Filter em duas etapas e repetir os passos.
5. Adicionar 600 µl de **Wash Buffer R1** ao RNA-RTA Spin Filter e centrifugar durante 1 min a 11.000 x g.
Descartar o RTA Receiver Tube com o filtrado e colocar o RNA-RTA Spin Filter num novo RTA Receiver Tube .
6. Adicionar 700 µl de **Wash Buffer R2** ao RNA-RTA Spin Filter e centrifugar durante 1 min a 11.000 x g.
Eliminar o filtrado e voltar a colocar o RNA-RTA Spin Filter no RTA Receiver Tube.
7. Adicionar 700 µl de **Wash Buffer R2** ao RNA-RTA Spin Filter e centrifugar durante 1 min a 11.000 x g.
Eliminar o filtrado e voltar a colocar o RNA-RTA Spin Filter no RTA Receiver Tube.
8. Centrifugar durante 4 minutos à velocidade máxima para eliminar completamente o etanol.
Descartar o RTA Receiver Tube com o filtrado.
9. Colocar o RNA-RTA Spin Filter num 1.5 ml Receiver Tube sem RNase.
Adicionar 30 - 100 µl de **Elution Buffer R** diretamente na superfície do RNA-RTA Spin Filter.
Incubar à temperatura ambiente durante 2 minutos e centrifugar durante 1 minuto a 11.000 x g.
Deite fora o RTA Spin Filter.
Fechar o 1.5 ml Receiver Tube e armazenar imediatamente o ARN eluído em gelo.
Utilizar diretamente para análise ou congelar a -80°C.

3.11 Protocolo suplementar (RUO): Extração de ARN de amostras líquidas, como misturas de reação ou fluidos corporais

1.a) Limpeza das amostras que não contêm ADN

Purificação de ARN a partir de 100 µl de amostra líquida

Pipetar 350 µl de **Lysis Solution TR contendo DTT** diretamente para o DNA-Binding Spin Filter colocado num 2.0 ml Receiver Tube. Para remover as partículas de suporte mineral de ligação ao ADN, centrifugar durante 2 minutos a 13.400 x g. Descartar o DNA-Binding Spin Filter. Recolher o filtrado para o seguinte procedimento de limpeza: adicionar 100 µl da amostra ao filtrado. **Em seguida, continuar com o passo 4 deste protocolo.**

Purificação de ARN a partir de 200 µl de amostra líquida

Pipetar 700 µl de **Lysis Solution TR contendo DTT** diretamente para o DNA-Binding Spin Filter colocado num 2.0 ml Receiver Tube. Para remover as partículas de suporte mineral de ligação ao ADN, centrifugar durante 2 minutos a 13.400 x g. Descartar o DNA-Binding Spin Filter. Recolher o filtrado para o seguinte procedimento de limpeza: adicionar 200 µl da amostra ao filtrado. **Em seguida, continuar com o passo 4 deste protocolo.**

1.b) Limpeza de amostras com ADN

Purificação de ARN a partir de 100 µl de amostra líquida

Adicionar 350 µl de **Lysis Solution TR contendo DTT** a 100 µl de amostra. Misturar bem, pipetando para cima e para baixo.

Purificação de ARN a partir de 200 µl de amostra líquida

Adicionar 700 µl de **Lysis Solution TR contendo DTT** a 200 µl de amostra. Misturar bem, pipetando para cima e para baixo.

2. Colocar um DNA-Binding Spin Filter num 2.0 ml Receiver Tube. Transferir todo o lisado, incluindo qualquer precipitado que se possa ter formado, para o DNA-Binding Spin Filter.
Incubar 1 min.
Centrifugar 2 minutos a 11.000 x g.
Descartar o DNA-Binding Spin Filter.
3. Adicionar 250 µl (volume inicial da amostra: 100 µl) ou 500 µl (volume inicial da amostra: 200 µl) de **etanol a 96-100%** ao lisado.
Misturar bem, pipetando para cima e para baixo.
4. Transferir toda a mistura de reação para o RNA-RTA Spin Filter.
Incubar durante 1 min
Centrifugar 2 minutos a 11.000 x g.
Se o volume da amostra for superior a 700 µl, separar o carregamento do RNA-RTA Spin Filter em duas etapas.
Eliminar o filtrado e voltar a colocar o RNA-RTA Spin Filter no RTA Receiver Tube.
Se o volume da amostra for superior a 700 µl, separar o carregamento do RNA-RTA Spin Filter em duas etapas e repetir os passos.
5. Adicionar 600 µl de **Wash Buffer R1** ao RNA-RTA Spin Filter e centrifugar durante 1 min. a 11.000 x g.
Descartar o filtrado e colocar o RNA-RTA Spin Filter num novo RTA Receiver Tube.

6. Adicionar 700 µl de **Wash Buffer R2** ao RNA-RTA Spin Filter e centrifugar durante 1 min a 11.000 x g.
Eliminar o filtrado e voltar a colocar o RNA-RTA Spin Filter no RTA Receiver Tube.
7. Adicionar 700 µl de **Wash Buffer R2** ao RNA-RTA Spin Filter e centrifugar durante 1 min a 11.000 x g.
Eliminar o filtrado e voltar a colocar o RNA-RTA Spin Filter no RTA Receiver Tube.
8. Centrifugar durante 4 minutos à velocidade máxima para eliminar completamente o etanol.
Descartar o RTA Receiver Tube com o filtrado.
9. Colocar o RNA-RTA Spin Filter num 1.5 ml Receiver Tube sem RNase.
Adicionar 30 - 100 µl de **Elution Buffer R** diretamente na superfície do RNA-RTA Spin Filter.
Incubar durante 2 minutos e centrifugar durante 1 minuto a 11.000 x g.
Deite fora o filtro de centrifugação RTA.
Fechar o 1.5 ml Receiver Tube e armazenar imediatamente o ARN eluído em gelo.
Utilizar diretamente para análise ou congelar a -80°C.

4. Apêndice

4.1 Resolução de problemas

Problema	Causa possível	Recomendação
Pouca quantidade de ARN	Eluição incompleta	Aumentar o tempo de incubação com o tampão de eluição R para 5-10 min. Eluir duas vezes com os mesmos 100 µl de tampão de eluição R .
	Desorganização ou homogeneização insuficientes	Reduzir a quantidade de material de partida, não sobrecarregar o kit.
	Remoção incompleta do meio de cultura celular.	Certifique-se de que o meio de cultura celular é completamente removido após a colheita das células.
ARN degradado	Armazenamento incorreto do material inicial, material antigo	Assegurar que a amostra é colhida e armazenada corretamente. Utilizar material de amostra fresco.
	Manuseamento incorreto do material inicial	O protocolo de purificação deve ser efetuado sem interrupções. Consulte a secção FAQ da página Web da Invitex para obter notas gerais sobre o manuseamento do ARN.
	A Lysis Solution TR não contém DTT	Assegurar que o DTT é adicionado à Lysis Solution TR.
ARN impuro	Transporte de eritrócitos no protocolo sanguíneo	Prolongar a incubação em gelo até 20 min. O pellet de leucócitos deve ser branco e pode conter vestígios residuais de eritrócitos. Se a lise dos eritrócitos for incompleta, o pellet branco pode não ser visível e os eritrócitos formarão um pellet vermelho. Se isto acontecer, incubar durante mais 5-10 minutos em gelo após a adição do Buffer EL .
Contaminação do ADN	Demasiado material inicial	Reduzir a quantidade de material inicial. Efetuar uma digestão com DNase do eluato.
	Matriz transportadora de ligação ao ADN insuficiente	Agitar cuidadosamente a Lysis Solution TR antes de a utilizar para garantir uma distribuição adequada da matriz transportadora de ligação ao ADN
Os ácidos nucleicos não têm um bom desempenho em aplicações posteriores	Transferência de etanol durante a eluição	Aumentar o tempo da fase de secagem para remover o etanol.
	Transferência de sal durante a eluição	Verificar se existem precipitados de sal nos Wash Buffer . Se forem visíveis quaisquer precipitados, resolvê-los aquecendo cuidadosamente até 30°C Assegurar que os Wash Buffer estão à temperatura ambiente antes da utilização.
Baixo rácio A_{260}/A_{280}	O ARN foi diluído com água	Não utilizar água livre de RNase para diluir a amostra para a medição da pureza do ARN. Recomenda-se a utilização de um tampão neutro (10 mM Tris/ HCl pH 7,0).

4.2 Garantia

A Invitek Diagnostics garante o funcionamento correto do kit para as aplicações descritas neste manual e de acordo com a utilização prevista. Em conformidade com o Sistema de Gestão da Qualidade da Invitek Diagnostics, certificado pela norma EN ISO 13485, o desempenho de todos os componentes do kit foi testado para garantir a qualidade do produto.

Quaisquer problemas, incidentes ou defeitos devem ser comunicados à Invitek Diagnostics imediatamente assim que forem detectados. Após a receção, inspecione o produto para garantir que está completo e intacto. Em caso de discrepâncias, o utilizador deve informar imediatamente a Invitek Diagnostics por escrito. Modificações no kit e nos protocolos, bem como usos que se desviem do propósito original, não estão cobertos por qualquer garantia.

A Invitek Diagnostics reserva-se o direito de mudar, alterar ou modificar qualquer produto para melhorar o seu desempenho e design em qualquer momento.

A Invitek Diagnostics garante os produtos conforme estabelecido nos Termos e Condições Gerais disponíveis em www.invitek.com. Caso tenha alguma dúvida, contacte techsupport@invitek.com.

4.3 Símbolos utilizados no produto e na rotulagem

	Fabricante
	Número do lote
	Identificador único de um dispositivo médico
	Número de catálogo
	Data de expiração
	Consultar o manual de instruções
	Limitação da temperatura
	Não reutilizar
	Quantidade de preparações de amostras
	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	Data de fabrico
	Marcação CE de Conformidade

4.4 Outros documentos e informações complementares

Visite www.invitek.com para obter mais informações sobre:

- FAQs e dicas de resolução de problemas
- Manuais em diferentes línguas
- Fichas de dados de segurança (FDS)
- Apoio Web
- Vídeos de produtos

Se, apesar da leitura atenta do manual de instruções e de outras informações, continuar a necessitar de assistência, contacte-nos através do endereço techsupport@invitek.com ou o revendedor responsável por si.

4.5 Informações para encomenda

Produto	Tamanho da embalagem	N.º de catálogo
InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit	50 preparações	1060100200
InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit	250 preparações	1060100300

Histórico de revisões

Revisão	Data	Descrição
DE 816.01	2025-04-22	Novo documento



INVITEK
diagnostics

PORTUGAL

Zona Industrial de Tondela, ZIM II, Lote 6
3460-070 Tondela
Portugal

Phone: +351 232 817 817

GERMANY

Haynauer Str. 60, 12249
Berlin, Germany

info@invitek.com
www.invitek.com